

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP2006/309222

International filing date: 27 April 2006 (27.04.2006)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2005-132929  
Filing date: 28 April 2005 (28.04.2005)

Date of receipt at the International Bureau: 01 June 2006 (01.06.2006)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2005年 4月28日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2005-132929

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号

The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

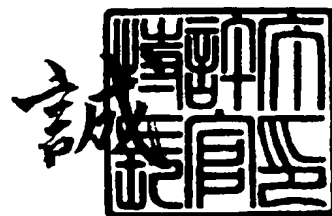
J P 2005-132929

出 願 人  
Applicant(s): キヤノン株式会社

2006年 5月17日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

中 嶋



【書類名】	特許願
【整理番号】	0019826-01
【提出日】	平成17年 4月28日
【あて先】	特許庁長官 殿
【国際特許分類】	G01N 33/53
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
【氏名】	山道 淳太
【特許出願人】	
【識別番号】	000001007
【氏名又は名称】	キヤノン株式会社
【代理人】	
【識別番号】	100123788
【弁理士】	
【氏名又は名称】	宮崎 昭夫
【電話番号】	03-3585-1882
【選任した代理人】	
【識別番号】	100106138
【弁理士】	
【氏名又は名称】	石橋 政幸
【選任した代理人】	
【識別番号】	100120628
【弁理士】	
【氏名又は名称】	岩田 慎一
【選任した代理人】	
【識別番号】	100127454
【弁理士】	
【氏名又は名称】	緒方 雅昭
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	201087
【納付金額】	16,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1
【物件名】	要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

基板と、該基板の表面に設けられた金属構造体と、該金属構造体上に配置された標的物質捕捉体と、を有する標的物質検出用の素子であって、

前記金属構造体が、ループ部及び分岐部の少なくとも 1 つを有することを特徴とする標的物質検出用の素子。

【請求項 2】

前記金属構造体は、任意に選択した 2 つの端部間の最大長さ（端部間長）が 10 nm～1450 nm の範囲にある請求項 1 に記載の素子。

【請求項 3】

前記 2 つの端部間の最大長さ（端部間長）が 50 nm～450 nm の範囲にある請求項 2 に記載の素子。

【請求項 4】

前記金属構造体の複数を有し、各金属構造体が互いに離間して設けられている請求項 1～3 のいずれかに記載の素子。

【請求項 5】

隣接する 2 つのパターン間の距離は、50 nm～2000 nm の範囲にある請求項 4 に記載の素子。

【請求項 6】

隣接する 2 つのパターン間の距離は、150 nm～1000 nm の範囲にある請求項 5 に記載の素子。

【請求項 7】

前記金属構造体は、金、銀、銅及びアルミニウムのいずれかの金属、もしくはそれらの合金からなる請求項 1～6 のいずれかに記載の素子。

【請求項 8】

前記基板は、光学的に透明である請求項 1～7 のいずれかに記載の素子。

【請求項 9】

基板と、該基板の表面に設けられた複数の金属構造体と、該金属構造体上に配置された標的物質捕捉体と、を有する標的物質検出用の素子であって、

前記金属構造体が、隣接する金属構造体との距離が 50 nm～2000 nm の範囲内で、前記基板上に規則的に配されていることを特徴とする標的物質検出用の素子。

【請求項 10】

標的物質を検出するための装置であって、

請求項 1～9 のいずれかに記載の標的物質検出用の素子を保持するための保持手段と、該素子による標的物質の捕捉を検出するための検出手段と、を有することを特徴とする標的物質の検出装置。

【請求項 11】

前記検出手段が、光学的検出手段である請求項 10 に記載の検出装置。

【請求項 12】

前記光学的手段が、プラズモン共鳴法により前記素子に標的物質が捕捉された状態を検出するものである請求項 11 に記載の検出装置。

【請求項 13】

前記光学的手段が、前記素子からの透過光、散乱光または反射光を測定するものである請求項 11 または 12 に記載の検出装置。

【請求項 14】

前記素子に検体を接触させるための反応領域を更に有する請求項 10～13 のいずれかに記載の検出装置。

【請求項 15】

前記素子に対して検体を移動させる手段を有する請求項 14 に記載の検出装置。

【請求項 16】

検体中での標的物質の有無または該標的物質の量を検出するための検出方法であって、請求項 1～9 のいずれかに記載の標的物質検出用の素子と、前記検体とを接触させる工程と、

前記検体中に標的物質が含まれている場合における前記素子への標的物質の捕捉を検出する工程と、

を有することを特徴とする標的物質の検出方法。

【請求項 17】

前記検出手段が、光学的検出手段である請求項 16 に記載の検出方法。

【請求項 18】

前記光学的手段が、プラズモン共鳴法により前記素子に標的物質が捕捉された状態を検出するものである請求項 17 に記載の検出方法。

【請求項 19】

前記光学的手段が、前記素子からの透過光、散乱光または反射光を測定するものである請求項 17 または 18 に記載の検出方法。

【請求項 20】

前記素子に検体を接触させるための反応領域を更に有する請求項 16～19 のいずれかに記載の検出方法。

【請求項 21】

前記素子に対して検体を移動させる手段を有する請求項 20 に記載の検出方法。

【請求項 22】

検体中における標的物質の有無または前記標的物質の量を検出するためのキットであって、請求項 1～9 のいずれかに記載の標的物質検出用の素子と、請求項 10～15 のいずれかに記載の検出装置と、標的物質の前記素子への捕捉に必要な試薬と、を有することを特徴とする標的物質検出用キット。

【書類名】明細書

【発明の名称】標的物質検出用の素子及びそれを用いた標的物質の検出方法、並びにそのための検出装置及びキット

【技術分野】

【0001】

本発明は、検体中における標的物質の有無を検出するために有用な標的物質検出用の素子、標的物質検出装置、検出方法及び検出用キットに関する。

【背景技術】

【0002】

従来より、金属微粒子を基板表面に固定化し、そこに誘起される局在プラズモン共鳴を利用して金属微粒子近傍の物質を検出する測定法が知られている。金や銀などの金属微粒子に光を入射すると、局在プラズモン共鳴により特徴的な共鳴スペクトルが現れる。その共鳴波長は金属微粒子近傍の媒質の誘電率に依存することが知られている。その誘電率が大きくなるに従い、共鳴ピークの吸光度は大きくなり、長波長側へシフトするようになる。例えば、岡本ら（特許第3452837号明細書）は、直径約20nmの金コロイドを用いた系を提案している。これは、基板に固定した金属微粒子の直径程度の距離までにある媒質の屈折率を検出するようにしたものであり、その結果、金属微粒子表面への物質の吸着や堆積を検出することができる。また、向井（特開2004-279364号公報）は、同様の測定法に於いて、ポリスチレンなどの透明基板上に微細孔と金属微粒子を設け、光学的な測定に適した素子構成を提案している。納谷（特開2004-232027号公報）は、微粒子の局在プラズモン共鳴と近接する金属薄膜の表面プラズモン共鳴の相互作用を利用し、微小な媒質の屈折率変化や特定物質との結合を検出できる素子を提案している。

【0003】

更に、Richard P. Van Duyneら（J. Am. Chem. Soc.、2005年、127巻、7号、p. 2264-p. 2271）は、素子に用いる銀微粒子の形状そのものに三角形という特徴を持たせ、検出能力の向上を図っている素子構成例を開示している。

【0004】

一方、本発明が応用可能であるバイオセンサは、生体や生体分子の持つ優れた生体分子認識能を利用した計測デバイスであり、近年、医療分野のみならず、環境や食料品等への幅広い応用が期待されている。

【0005】

一般的に、バイオセンサは、測定対象とする物質（以下、標的物質）を認識、捕捉する捕捉体と、その時発生する物理的、化学的な変化を検知し、電気信号、光信号等の検出可能な信号へ変換する検出素子と、から構成される。生体内には、互いに親和性のある物質の組み合わせとして、例えば酵素-基質、抗原-抗体、DNA-DNA等があり、バイオセンサではこれらの組み合わせの一方を基材に固定化もしくは担持し、捕捉体成分として用いることによって、もう一方の物質を選択的に計測できるという原理を利用している。また、検出素子としては、酸素電極、過酸化水素電極、イオン電極、ISFET、サーミスタなど様々な形式のものが提案されており、最近ではナノグラム程度の質量変化が検出できる水晶振動子やSAW素子、プラズモン共鳴素子などが使われる場合もある。

【特許文献1】特許第3452837号明細書

【特許文献2】特開2004-279364号公報

【特許文献3】特開2004-232027号公報

【非特許文献1】J. Am. Chem. Soc.、2005年、127巻、7号、p. 2264-p. 2271

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

局在プラズモン共鳴を利用した測定法は、蛍光色素などの標識分子が必要でないためアッセイの構成が簡単であること、また、金属微粒子表面への吸着反応の過程を直接リアルタイム・モニタリングできること、などの特長を有しており、各種のアッセイへの適用が期待されている。しかしながら、これまでのプラズモン共鳴を利用して標的物質を検出するための素子を用いて、抗原抗体反応の特異性を利用したイムノ・アッセイなどのアフィニティ・アッセイを行なった場合、十分な検出感度が得られない場合があった。この検出感度に関する課題は、既存の蛍光免疫法や化学発光免疫法に代えて、プラズモン共鳴を利用する検出方法をアフィニティ・アッセイに適用する場合における解決すべき課題の一つである。すなわち、上述の検出感度にかかる問題は、局在プラズモン共鳴を利用した測定法の用途拡大への大きな課題である。

#### 【0007】

本発明は、上記の背景技術における課題鑑みてなされたものであり、その目的は、局在プラズモン共鳴を利用した標的物質の検出における検出感度を向上させることのできる構成を有する標的物質検出用素子、それを用いた標的物質の検出方法、そのための装置及びキットを提供することにある。

#### 【0008】

本発明のかかる標的物質検出用素子は、基板と、該基板の表面に設けられた金属構造体と、該金属構造体上に配置された標的物質捕捉体と、を有する標的物質検出用の素子であって、前記金属構造体が、ループ部及び分岐部の少なくとも一つを有することを特徴とする標的物質検出用の素子である。また、本発明の別の標的物質検出用の素子は、基板と、該基板の表面に設けられた複数の金属構造体と、該金属構造体上に配置された標的物質捕捉体と、を有する標的物質検出用の素子であって、前記金属構造体が、隣接する金属構造体との距離が50nm～2000nmの範囲内で、前記基板上に規則的に配されていることを特徴とする標的物質検出用の素子である。

#### 【0009】

本発明にかかる標的物質検出用素子の他の態様は、基板と、該基板の表面に設けられた複数の金属構造体と、該金属構造体上に配置された標的物質捕捉体と、を有する標的物質検出用の素子であって、前記金属構造体が、隣接する金属構造体との距離が50nm～2000nmの範囲内で、前記基板上に規則的に配されていることを特徴とする標的物質検出用の素子である。

#### 【0010】

本発明にかかる標的物質の検出装置は、標的物質を検出するための装置であって、上記構成の標的物質検出用の素子を保持するための保持手段と、該素子による標的物質の捕捉を検出するための検出手段と、を有することを特徴とする標的物質の検出装置である。

#### 【0011】

本発明にかかる標的物質の検出方法は、検体中での標的物質の有無または量を検出するための検出方法であって、上記構成の標的物質検出用の素子と、前記検体とを接触させる工程と、前記検体中に標的物質が含まれている場合における前記素子への標的物質の捕捉を検出する工程と、を有することを特徴とする標的物質の検出方法である。

#### 【0012】

本発明にかかる標的物質検出用のキットは、検体中における標的物質の有無または量を検出するためのキットであって、上記構成の標的物質検出用の素子と、上記構成の検出装置と、標的物質の前記素子への捕捉に必要な試薬と、を有することを特徴とする標的物質検出用キットである。

#### 【発明の効果】

#### 【0013】

本発明によれば、局在プラズモン共鳴を利用した標的物質の検出に用いる標的物質検出用の素子における基板上の設けた局在プラズモン共鳴発生用の金属構造体の形状及び配置を工夫するという構成変更によって標的物質の検出感度を向上させることが可能となる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

以下、本発明に含まれる各態様について詳細に説明する。

【0015】

（標的物質検出用の素子）

本発明にかかる標的物質検出用の素子（検出素子）は、基板と、基板の表面に設けられた局在プラズモン共鳴発生用の金属構造体と、金属構造体に設けられた標的物質の捕捉体と、を少なくとも有して構成される。本発明の素子では、金属構造体の配置の最適化と金属構造体の平面形状（金属パターン）を特定の形状としたことで標的物質の検出感度を向上させるものである。なお、金属構造体の平面形状とは、基板面と平行な面における金属構造体の形状をいい、基板表面を上方から見たときの平面図における形状をいう。

【0016】

本発明では、金属構造体の平面形状は、ループ部と分岐部の少なくとも1つを有する。金属構造体（金属構造体）の一例を、図1（A）～（E）及び図2（A）～（F）にそれぞれ示す。図1には、多角形あるいは円形をなすループ部（周回構造）を主体として構成されたものが、図2には、分岐部を主体として構成されたものが示されている。

【0017】

ループ部を有する金属構造体の平面形状としては、図1（A）～（C）に示すようなループ部のみからなるリング状や、図1（D）のように、その一部分にループ部を有する形状を挙げることができる。更に、図1（E）のようにリングの内側の形状が外側の形状と異なる形状でもよい。また、同一金属構造体に2以上のループを結合したパターンとすることもできる。

【0018】

分岐部を有する金属構造体の平面形状としては、図2（A）及び（B）に示すように、少なくとも2本の帯状部により交差部が形成された形状、図2（C）乃至（E）にあるように、交差部において帯状部の少なくとも1つが交差部で封止されて、他方の側へ突き抜けていない形状などを挙げることができる。更に、図2（F）のように、製法上、交差部の角が鋭角に形成されずに、丸く鈍ったような形状を形成していてもよい。また、帯状部の交差する角度は、直角に限定されない。更に、図2に示す例では、帯状部は直線的に伸びているが、帯状部は曲線的に伸びているものであってもよい。

【0019】

金属構造体の形成に用いる材料としては、金、銀、銅及びアルミニウムのいずれかの金属、もしくはそれらの合金を用いることができる。金属構造体は、基板との密着性の観点から、基板との間にクロムあるいはチタンなどの薄膜を介して、基板上に形成されていてもよい。

【0020】

金属構造体は、10 nmから100 nm程度の膜厚で形成される。

【0021】

金属構造体の平面形状における大きさ、すなわち、外周部における任意の一点から他の点までの距離は、10 nm～1450 nmの範囲内にあることが好ましい。更には、50 nm～450 nmの範囲内にあることが好ましい。この場合、任意の2点間の最大距離がこの範囲に入っていればよい、例えば、図18に示す井桁状のパターンの場合では点XY間の距離が最大であるので、この距離を上記の範囲内とする。また、同様に矩形リングパターンの場合でも外周形状のXY間の対角線Lの距離が最大であるのでLを上記の範囲内とする。図1（C）に示す円形リングパターンでは、外周円の直径を上記の範囲とする。金属構造体の平面形状の大きさがこの範囲にあることで、目的とする検出感度を達成できる局在プラズモン共鳴を更に効果的に得ることができる。

【0022】

一方、金属構造体は帯状の部分の基本として構成されており、この帯状部分の幅（帯幅）は、金属構造体の形成が可能であり、かつ本発明が目的とする局在プラズモン共鳴が得られるものであれば特に限定されない。帯幅は、10 nm～100 nmの範囲とすること



が好ましい。この帯幅は、例えば図1(C)の円形リングパターンの場合には、外周円と内周円の半径の差であり、図18に示すパターンの場合にはWで示される部分である。また、帯状のパターンの幅は同一金属構造体中で同一であっても、帯幅に異なる部分があってもよい。

#### 【0023】

金属構造体は、必要に応じて基板上に1個以上を設ける。複数個設ける場合には、各金属構造体の間隔は、好ましくは50nm～2000nm、より好ましくは150nm～1000nmの範囲から選択した距離とすることが好ましい。これは、金属構造体同士のプラズモンによる相互作用により空間的な電場の分布・強度に影響があるためである。また、間隔が大きくなると、金属構造体の密度が下がり、信号強度が弱くなってしまうため、特殊な光学系を適用する必要性が出てくるので、上記範囲にあることが好ましい。

#### 【0024】

複数の金属構造体を設ける場合は、平面形状及びその大きさの少なくとも1つにおいて異なる複数種類の金属構造体を基板上に設けることができる。金属構造体の製造効率や検出系の構成を簡便化する点などを考慮した場合は、図3及び4に示すように、数mm角程度の領域に同一形状及び大きさの金属構造体を規則的にアレイ状に基板上に配置することが好ましい。このような配置とすることで、透過光や散乱光、反射光の測定を容易にすることができる。

#### 【0025】

金属構造体の膜厚、外形、帯幅、構造体間隔は、局在プラズモン共鳴スペクトルのピーク位置に影響するため、測定に適したサイズに形成するものとする。金属構造体の平面形状をループ部及び／または分岐部を有するものとするることによる検出感度の向上は、1つの金属構造体における輪郭長さが増大すること、分岐部を利用する場合には更に角部の数が増加すること、金属構造体の平面形状におけるエッジ間の距離を小さくできること、などが相乗的に関与しているものと考えられる。例えば、図1(A)～(C)で示される形状における中抜き部分(白地部)がない場合には、金属構造体の輪郭長は外周部分のみとなる。これに対して、図1(A)～(C)におけるように中抜き部分を有することで、金属構造体の輪郭長は、外周部と内周部の2つの合計となり、輪郭長が増加する。更に、図1(A)の場合では、角部は合計8個であり、中抜き部分がない場合の4の2倍となる。また、図1(A)の場合において中抜き部分Hがない場合は、外周を形成するエッジ部E1上での2点間の距離(エッジ間距離)は正方形の対峙する2辺の間隔となる場合に最小となるのに対して、中抜き部分Hがある場合にはエッジ間距離は外周エッジE1と内周エッジE2の間での最大距離pとなり、同一の大きさの金属構造体内でエッジ間距離を短縮することができる。

#### 【0026】

図1(C)で示されるリング形状の場合では、輪郭長が外周部と内周部との合計となり、エッジ部の表面プラズモンの増強領域が拡大され、更に、リングの内側と外側のエッジが近接するので表面プラズモン同士が相互作用し表面プラズモンが更に大きく増強されるという効果が期待できる。

#### 【0027】

一方、図2(D)に示す分岐部を有するH型金属構造体でも、同じ外形サイズを有するが、分岐部を持たない正方形(中抜き部なし)の形状に比べ、輪郭長が増大し、かつエッジ間距離も近くなる。更に、角部の個数も正方形の4に対して12と増大する。かかる形状に基づく金属構造体の構造は、表面プラズモンの増強領域が大きくなり、実効的な検出領域の割合が増大する、また、角部や交差部では近接する表面プラズモン同士が相互作用し表面プラズモンが大きく増強されるなどの特徴を有する。

#### 【0028】

なお、本発明者らは、100nm×100nmのサイズの正方形のパターンを金属のエッジ部が増えるようにみじん切りにして、各10nm×10nmの断片に細分化して配置したものでは、本発明において目的とする検出感度の増強効果が得られにくいことを確認

している。

#### 【0029】

金属構造体を形成するための基板としては、光学的に透明な、ガラス基板、石英基板、ポリカーボネートやポリスチレンなどの樹脂基板やITO基板などを用いることができる。すなわち、プラズモン共鳴法による検出を可能とする基板であればよい。

#### 【0030】

本発明にかかる標的物質検出用素子は、基板の所定位置に金属構造体を形成し、更に、金属構造体上に捕捉体を配置することにより得ることができる。その製造方法の一例を図5に示す。図5に示したように、まず、基板1上に金属薄膜2をスパッタ法あるいは蒸着法により成膜する(図5(B))。その上に電子線レジスト3をスピンコートにより成膜し(図5(C))、電子線描画装置で露光し、現像後レジストパターンを得る(図5(D))。その後、不要な金属薄膜をエッチングし(図5(E))、レジストを除去して、アレイ状に配置した金属構造体4を形成する(図5(F))。電子線描画装置の他、集束イオンビーム加工装置、X線露光装置、EUV露光装置によるパターンニングで作製することもできる。

#### 【0031】

また、図6に示したように、モールド法により作製した微細な凹凸の基板1(図5(A))を用いた作製方法も可能である。この場合、基板1上に金属薄膜2をスパッタ法あるいは蒸着法により成膜する(図6(B))。次に表面の金属膜を研磨し、所望の金属構造体を基板上に形成する(図6(C))。同様に図7は、金属薄膜2が基板1の凹凸よりも薄い場合の作製方法を示すものである。この場合、基板1の凸部が金属薄膜3表面より上部にあってもよいし、凹凸部の壁面に金属薄膜3が成膜されていてもよい。ここで、研磨する代わりに金属膜をドライエッチングによるエッチバックを利用して除去することも可能である。

#### 【0032】

素子への標的物質捕捉能の付与には、図8にあるように抗体5などの化学物質を標的物質6の捕捉体として用いるのが好ましい。抗体を金属構造体上に固定すると、金属構造体上に標的物質が近づくと特異的に複合体を形成し、基板表面における誘電率(屈折率)を変化させる。抗体の他には、このような複合体形成の他の例としては、酵素と基質の複合体、DNAのハイブリダイゼーションによる相補的な塩基対形成などが挙げられ、これらの複合体の一方を他方の捕捉体として利用することができる。これらの捕捉体は、物理的あるいは化学的な方法により、検出素子の表面に固定化される。また、素子の表面は、いわゆる非特異吸着による共雑物の吸着によるシグナルを防止するために、スキムミルクやカゼイン、ウシ血清アルブミン、リン脂質、ポリエチレングリコール及びそれらの誘導体などによるコーティングを行うと、なお好適である。

#### 【0033】

(検出装置及び検出方法)

次に、上記の構成の素子を用いた標的物質検出装置について説明する。本発明による検出装置は、上記構成の素子を保持する保持手段と、素子からの信号を検出するための検出手段と、を少なくとも有して構成される。

#### 【0034】

検出手段としては、光源と分光器、レンズ類から構成される光学検出系と、検体を素子まで移動させ素子との反応を起こさせるための反応領域を形成するための反应用ウェル、流路、送液機構等からなる送液系を有するものが好適に利用できる。光源としては、可視領域から近赤外領域までの波長領域をカバーできるものを用いることができる。光学測定は、吸収スペクトル、透過スペクトル、散乱スペクトル、反射スペクトルを用いることができる。最も好ましくは、吸収スペクトルのピーク波長あるいは、ピークの吸収強度を利用する。素子の有する金属構造体上に設けた捕捉体に標的物質が特異的に結合すると、局在プラズモン共鳴が非結合状態に対して変化し、吸収スペクトルのピーク波長は、長波長側にシフトし、吸収強度は増大する。そのシフト量の程度によって、あらかじめ作製して

おいた標的物質に対する検量線から標的物質の量を定量することができる。この素子は、局在プラズモン共鳴を利用しているので、金属構造体近傍では、局所的な電場増強が起こる。この現象は、表面増強ラマン分光法（SERS）や表面プラズモン蛍光分光法（SPFS）などの測定法にも応用でき、これらの方法による標的物質の定量も可能である。

#### 【0035】

反应用ウェルや流路は、いわゆる $\mu$ TAS（Micro Total Analysis System）型の装置で用いられているポリジメチルシロキサン（PDMS）基板によって、作製されるのが容易である。このPDMS基板を検出素子を作製してある基板と貼りあわせて図9のような形状にて使用するものとする。送液機構としては、マイクロピストンポンプやシリンジポンプなどを用いる。

#### 【0036】

次に、代表的な使用形態を図10に示す。まず、捕捉能を持つ素子18の保持手段と反応領域形成手段を兼ねる反応ウェル部7に、素子18を配置し、標的物質を含む検体を流路11を介して送液ポンプ10でインレット8より導入する。一定時間のインキュベーションを行い、その時の透過スペクトルを分光光度計13により測定する。中央演算装置14にて、あらかじめ作製してある検量用データと比較し、濃度などの測定結果を表示ユニット15に表示する。必要があれば、測定前にリン酸緩衝液などを洗浄液としてインレット8より導入し、反応ウェル部7を洗浄してもよい。ここで、一定時間後のスペクトル変化を静的に測定する他に、その変化を動的にリアルタイム測定することも可能である。その場合、時間変化率などを新たな情報として取得することができる。

#### 【0037】

捕捉する標的物質としては、生体物質（タンパク質、核酸、糖鎖、脂質等）やアレルギー、バクテリア、ウイルス等が好適である。さらに、検出装置は、生体由来の物質又はその類似物質を捕捉体成分として用いた、いわゆるバイオセンサに、医療用、産業用、家庭用を問わず、好適に応用できる。

#### 【0038】

（検出用キット）

上記構成の素子と、上記構成の検出装置と、標的物質の素子への捕捉に必要な試薬と、を少なくとも用いて標的物質検出用キットを構成することができる。

#### 【0039】

捕捉する標的物質としては、生体物質（タンパク質、核酸、糖鎖、脂質等）やアレルギー、バクテリア、ウイルス等が好適であり、さらに、検出装置は生体由来の物質又はその類似物質を捕捉体成分として用いた、いわゆるバイオセンサに医療用、産業用、家庭用を問わず、好適に応用できる。これにより、検体中の微量の標的物質を検出することができる。

#### 【実施例】

#### 【0040】

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明する。なお、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。

#### 【0041】

（実施例1）

図11に本実施例で用いた検出装置の概略の構造を示す。検出素子4は、膜厚20nmの金薄膜を625 $\mu$ m厚の石英基板上に形成し、これを所定のパターンに電子線描画装置を用いてパターンニングすることで製作した。図12の走査型電子顕微鏡（SEM）画像にあるように、金属構造体の平面形状の外形は160nm $\times$ 160nmの正形状、リングの帯幅は70nmである。解像性の高低により、内側の開口部の形状は、外形とは必ずしも同じに作製できるとは限らない。各パターンは、250nmのスペースを開けてアレイ状に3mm $\times$ 3mmの領域に配置されている。本実施例の構造体の吸収スペクトルは、800nm近傍にピーク波長を持っている。

#### 【0042】

次に、金属構造体の表面に捕捉能を付与するため、本実施例で用いる標的物質捕捉体である抗AFP ( $\alpha$ -fetoprotein) 抗体を金の構造体表面に固定する方法を示す。本実施例の構造体の材質である金と親和性の高いチオール基を持つ、11-Mercapto undecanoic acidのエタノール溶液をスポッタ等で素子上に滴下し、前記構造体表面を修飾する。これにより、構造体表面にカルボキシル基が露出される。その状態で、N-Hydroxysulfosuccinimide (同仁化学研究所社製) 水溶液と1-Ethyl-3-[3-dimethylamino]propyl carbodiimide hydrochloride (同仁化学研究所社製) 水溶液を同様にスポッタにて反応領域に滴下する。これにより、構造体表面にスクシンイミド基が露出される。さらに、ストレプトアビジンを結合させることにより、構造体表面がストレプトアビジンで修飾される。この構造体にビオチン化した抗AFP抗体を固定させる。

#### 【0043】

複数の検出素子のパターン領域を基板上に作製し、それぞれに異なる抗体を固定させ、検体中の異なる標的物質を同一基板上にて検出するような構成をとることも、可能であり、異なる抗体を用いて、前記の方法と同様の固定化操作を行うことで達成される。

#### 【0044】

以下の操作により、特異的に検体中のAFP濃度を測定することができる。

- (1) 作製した素子に標的物質であるAFPを含んだ検体をインレット8より導入し、AFPを構造体上に捕捉させる。
- (2) 検体を排出し、リン酸緩衝液をインレット8より導入し、反応ウェル7内部を洗浄する。
- (3) 最後にリン酸緩衝液を充填して、金の構造体の吸収スペクトルを測定する。

#### 【0045】

吸収スペクトルについて反応前と反応後と比較すると、図13に1例を示すように、特異的な抗原抗体反応によって標的物質が検出素子表面に結合することで吸収スペクトルがシフトする。ここで、吸収スペクトルのピーク強度、あるいはピーク波長のシフト量とAFP濃度の相関は、あらかじめ既知のAFPコントロール溶液により求められており、濃度未知の検体の微量AFP濃度を求めることができる。

#### 【0046】

##### (実施例2)

図14に本実施例で用いた概略の構造を示す。検出素子は、膜厚20nmの金薄膜を625 $\mu$ m厚の石英基板上に設け、これを電子線描画装置を用いてパターンニングすることで作製した。走査型電子顕微鏡(SEM)画像で確認すると、構造体の外形は150nm $\times$ 150nm、線幅は50nmである。描画プロセスの解像性の高低により、交差部の形状は、必ずしも直角に作製できるとは限らない。構造体と構造体の間は、400nmのスペースを開けてアレイ状に3mm $\times$ 3mmの領域に配置されている。

構造体の表面に捕捉能を付与するため、本実施例で用いる標的物質捕捉体である抗AFP ( $\alpha$ -fetoprotein) 抗体を金の構造体表面に固定する方法を示す。本実施例の構造体の材質である金と親和性の高いチオール基を持つ、11-Mercapto undecanoic acidのエタノール溶液をスポッタ等で素子上に滴下し、前記構造体表面を修飾する。これにより、構造体表面にカルボキシル基が露出される。その状態で、N-Hydroxysulfosuccinimide (同仁化学研究所社製) 水溶液と1-Ethyl-3-[3-dimethylamino]propyl carbodiimide hydrochloride (同仁化学研究所社製) 水溶液を同様にスポッタにて反応領域に滴下する。これにより、構造体表面にスクシンイミド基が露出される。さらに、ストレプトアビジンを結合させることにより、構造体表面がストレプトアビジンで修飾される。この構造体にビオチン化した抗AFP抗体を固定させる。

#### 【0047】

複数の検出素子のパターン領域を基板上に作製し、それぞれに異なる抗体を固定させ、

検体中の異なる標的物質を同一基板上にて検出するような構成をとることも、可能であり、異なる抗体を用いて、前記の方法と同様の固定化操作を行うことで達成される。

以下の操作により、特異的に検体中のAFP濃度を測定することができる。

(1) 作製した素子に標的物質であるAFPを含んだ検体をインレット8より導入し、AFPを構造体上に捕捉させる。

(2) 検体を排出し、リン酸緩衝液をインレット8より導入し、反応ウェル7内部を洗浄する。

(3) 最後にリン酸緩衝液を充填して、金の構造体の吸収スペクトルを測定する。

#### 【0048】

吸収スペクトルについて反応前と反応後を比較すると、図15に1例を示すように、特異的な抗原抗体反応によって標的物質が検出素子表面に結合することで吸収スペクトルがシフトする。ここで、吸収スペクトルのピーク強度、あるいはピーク波長のシフト量とAFP濃度の相関は、あらかじめ既知のAFPコントロール溶液により求められており、濃度未知の検体の微量AFP濃度を求めることができる。

#### 【0049】

(実施例3及び比較例1)

本実施例では、素子の構成を変えた以外は、実施例1と同様の構成の検出装置を用いた。本実施例で用いた検出素子は、膜厚20nmの金薄膜を625μm厚の石英基板上に形成し、これを電子線描画装置を用いてパターンニングして製作した。図16の走査型電子顕微鏡(SEM)画像にあるように、金属構造体の平面形状の外形は200nm×200nm、リングの帯幅は50nmである。解像性の高低により、内側の開口部の形状は、外形とは必ずしも同じに作製できるとは限らない。構造体と構造体の間は、250nmのスペースを開けてアレイ状に3mm×3mmの領域に配置されている。本実施例の金属構造体の吸収スペクトルは、大気中で1070nm近傍にピーク波長を持っている。図17に基本性能としての屈折率に対する応答性を示した。屈折率に対するこのピーク波長のシフトの大きさは、リング状の周回構造を持たない同一外周形状及び同サイズのパターン(比較例1)と比較すると、1.4倍程度増加した。

#### 【0050】

構造体の表面に捕捉能を付与するため、本実施例で用いる標的物質捕捉体である抗AFP( $\alpha$ -fetoprotein)抗体を金の構造体表面に固定する方法を示す。本実施例の構造体の材質である金と親和性の高いチオール基を持つ、11-Mercaptoundecanoic acidのエタノール溶液をスポッタ等で素子上に滴下し、前記構造体表面を修飾する。これにより、構造体表面にカルボキシル基が露出される。その状態で、N-Hydroxysulfosuccinimide(同仁化学研究所社製)水溶液と1-Ethyl-3-[3-dimethylamino]propyl]carbodiimide hydrochloride(同仁化学研究所社製)水溶液を同様にスポッタにて反応領域に滴下する。これにより、構造体表面にスクシンイミド基が露出される。さらに、ストレプトアビジンを結合させることにより、構造体表面がストレプトアビジンで修飾される。この構造体にビオチン化した抗AFP抗体を固定させる。

#### 【0051】

複数の検出素子のパターン領域を基板上に作製し、それぞれに異なる抗体を固定させ、検体中の異なる標的物質を同一基板上にて検出するような構成をとることも、可能であり、異なる抗体を用いて、前記の方法と同様の固定化操作を行うことで達成される。

#### 【0052】

実施例1と同様の操作により、特異的に検体中のAFP濃度を測定することができる。

#### 【0053】

吸収スペクトルの変化について反応前と反応後を比較すると、特異的な抗原抗体反応によって、標的物質が検出素子表面に結合することで実施例と同様の吸収スペクトルのシフトが観察された。ここで、吸収スペクトルのピーク強度、あるいはピーク波長のシフト量とAFP濃度の相関は、あらかじめ既知のAFPコントロール溶液により求められており

、濃度未知の検体の微量AFP濃度を求めることができる。

【図面の簡単な説明】

【0054】

【図1】本発明の実施の形態における金属構造体の各種平面形状を例示する模式図である。

【図2】本発明の実施の形態における金属構造体の各種平面形状の例示する模式図である。

【図3】本発明の実施の形態における検出素子の一例を示す模式図である。

【図4】本発明の実施の形態における検出素子の一例を示す模式図である。

【図5】本発明の実施の形態における検出素子の作製方法を説明する図である。

【図6】本発明の実施の形態における検出素子の作製方法を説明する図である。

【図7】本発明の実施の形態における検出素子の作製方法を説明する図である。

【図8】本発明の実施の形態における検出素子上の捕捉体の例を示す模式図である。

【図9】本発明の実施の形態における検出装置の一例を表す模式図である。

【図10】本発明の実施の形態における検出装置のブロック図である。

【図11】実施例1及び3の検出装置の模式図である。

【図12】実施例1の検出素子のSEM画像の1例である。

【図13】実施例1の検出スペクトル（吸収スペクトル）の変化の一例である。

【図14】実施例2の検出装置の模式図である。

【図15】実施例2の検出スペクトル（吸収スペクトル）の変化の一例である。

【図16】実施例3の検出素子のSEM画像の1例である。

【図17】実施例3で得られた検出素子における吸収スペクトルを示す図である。

【図18】金属構造体の平面パターンの大きさの測定基準を示す図である。

【符号の説明】

【0055】

- 1 基板
- 2 金属薄膜
- 3 電子線レジスト
- 4 金属構造体
- 5 抗体
- 6 標的物質
- 7 反応ウエル
- 8 インレット
- 9 アウトレット
- 10 送液ポンプ
- 11 流路
- 12 光源ユニット
- 13 分光光度計
- 14 中央演算装置
- 15 表示ユニット
- 16 廃液リザーバ
- 17 コリメータレンズ
- 18 素子

【書類名】 図面

【図 1】

(A)



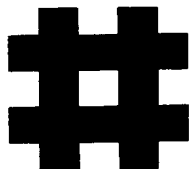
(B)



(C)



(D)



(E)



【図 2】

(A)



(B)



(C)



(D)



(E)

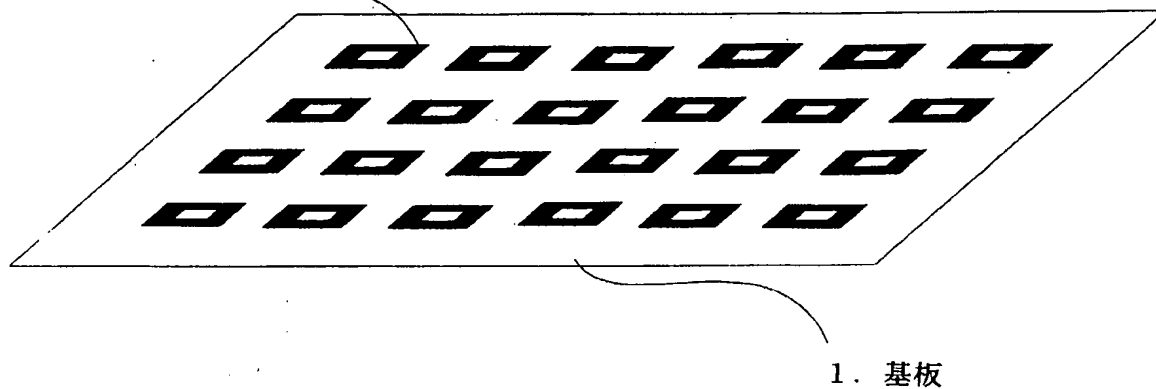


(E)



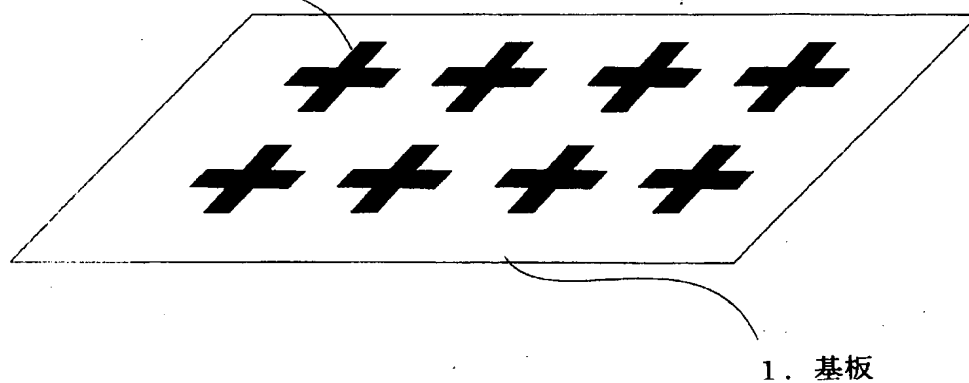
【図 3】

4. 周回構造を有する金属の構造体

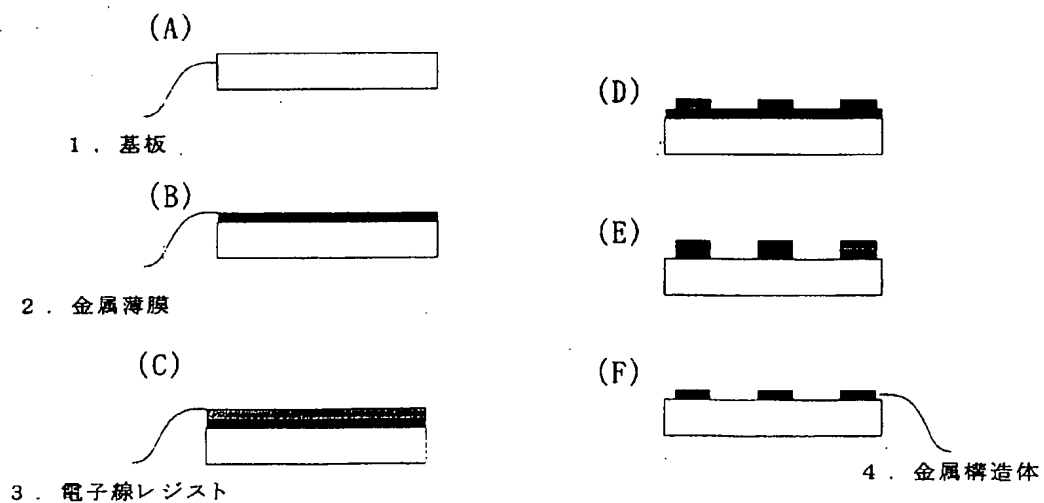


【図 4】

4. 交差部を有する金属の構造体

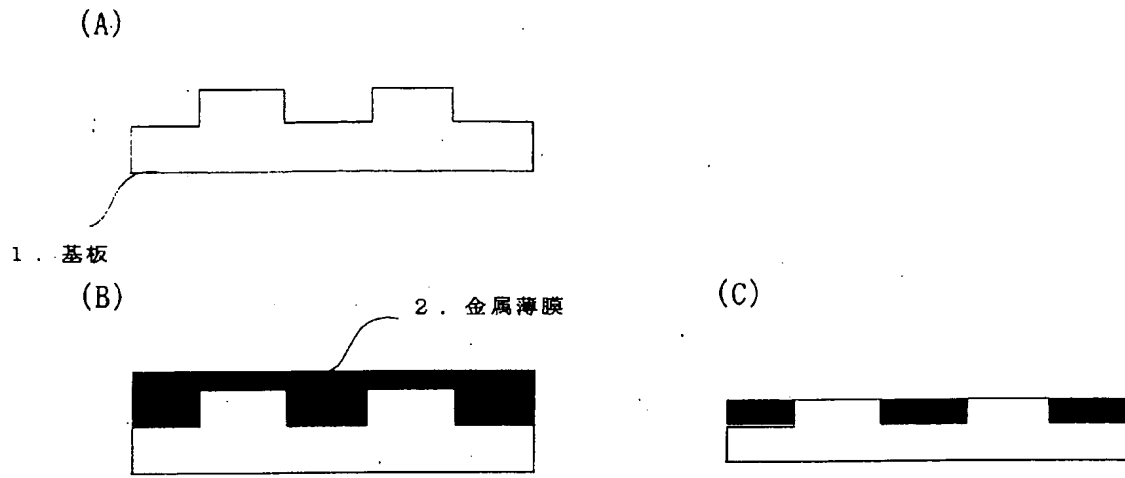


【図 5】

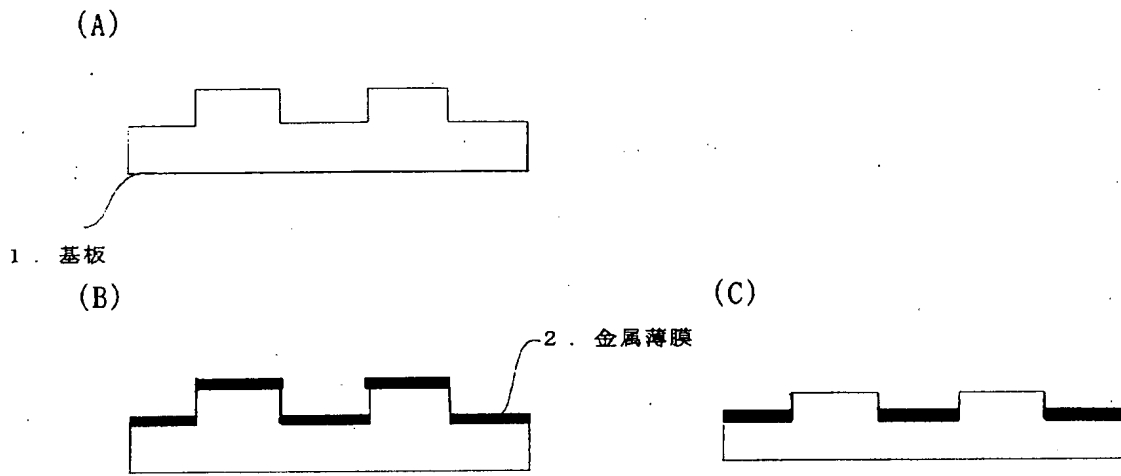




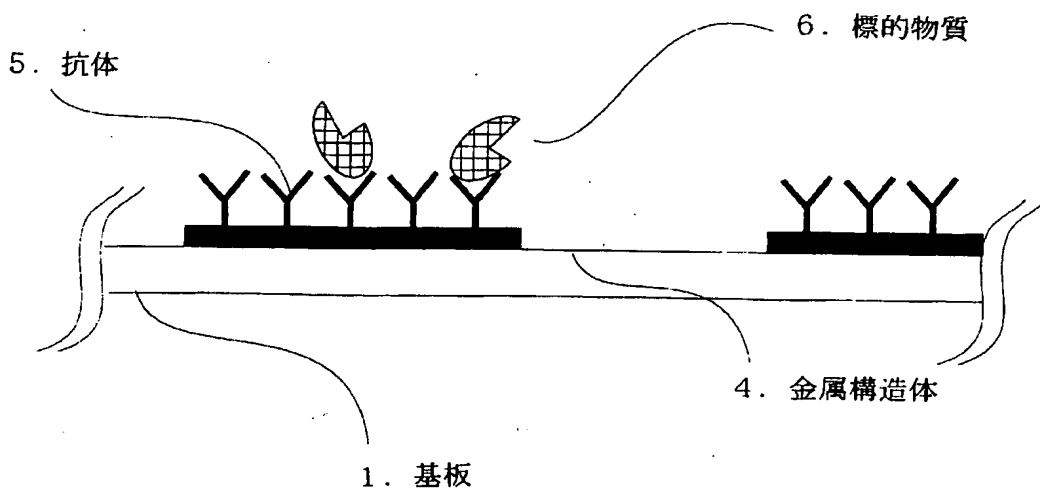
【图 6】



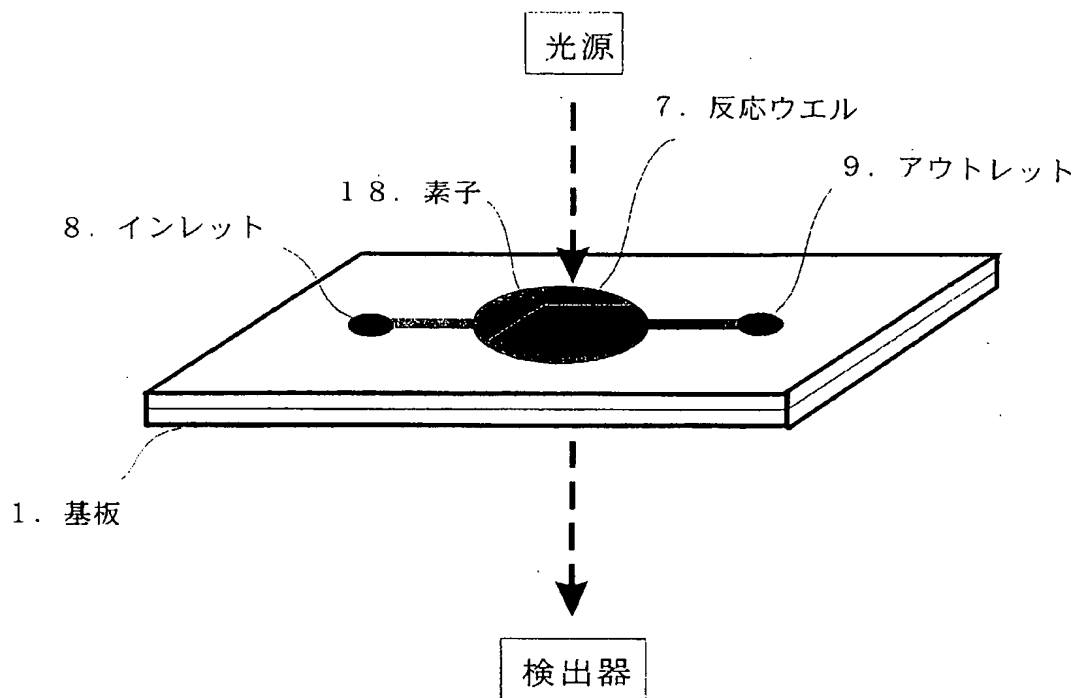
【图 7】



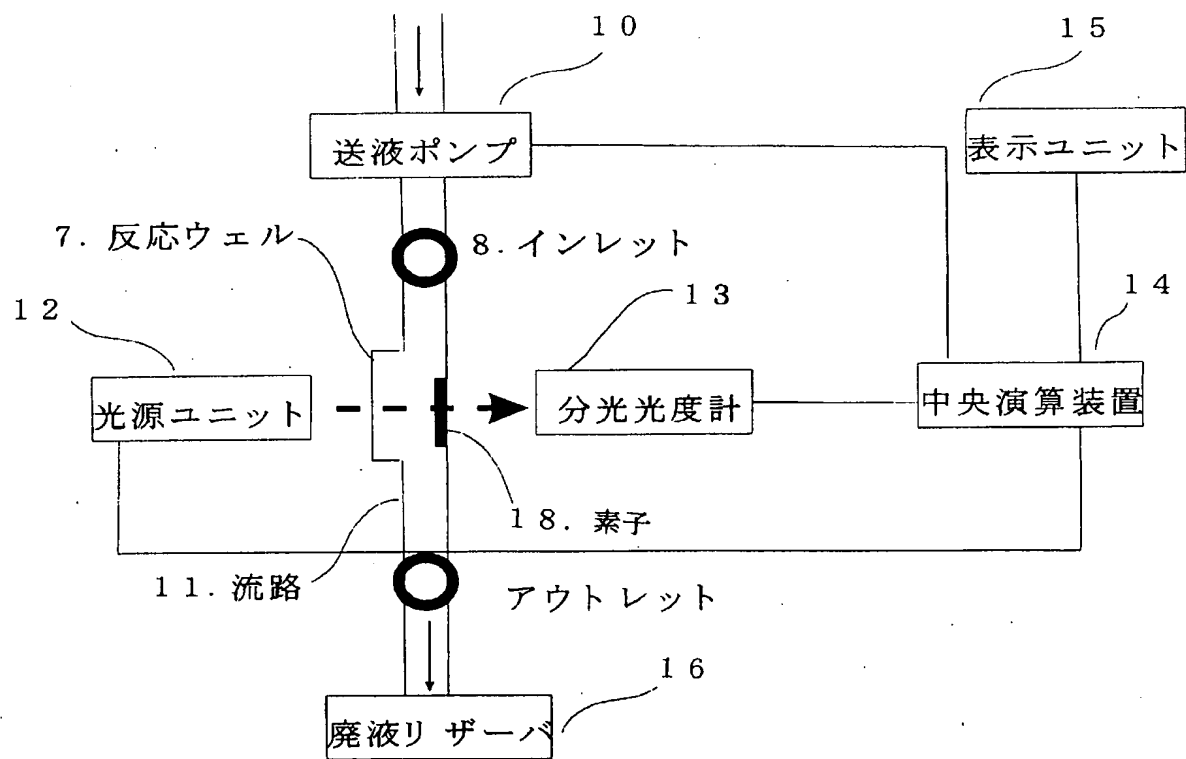
【图 8】



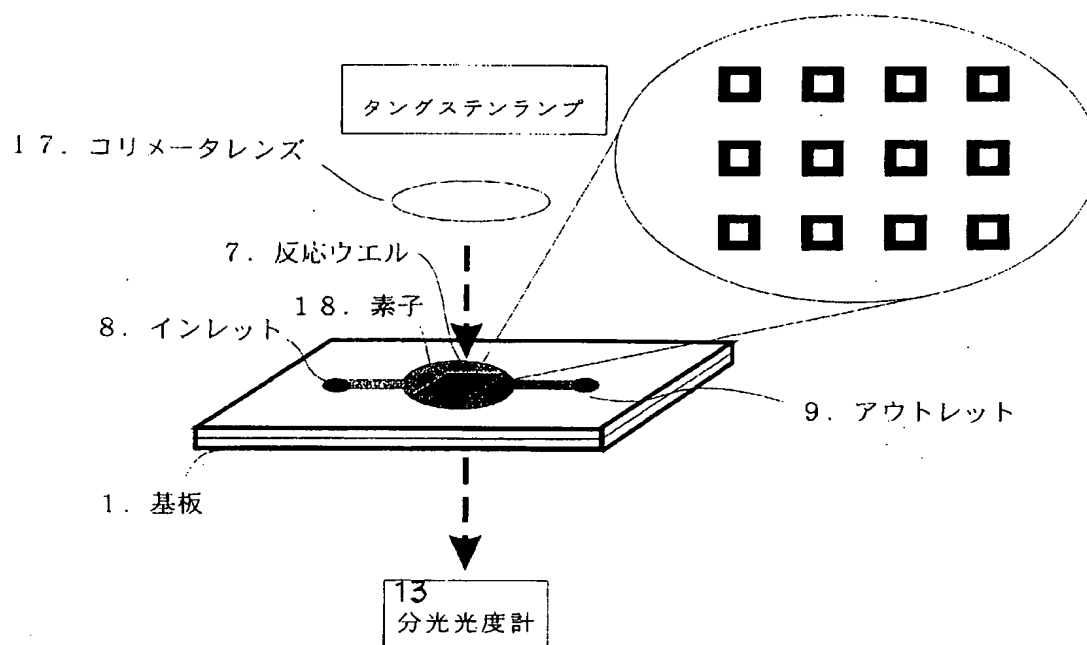
【図 9】



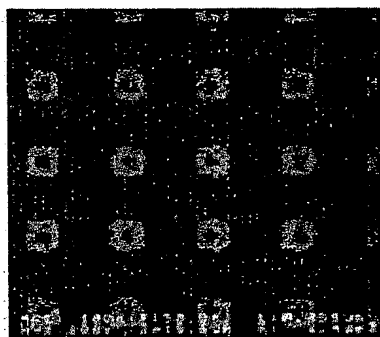
【図 10】



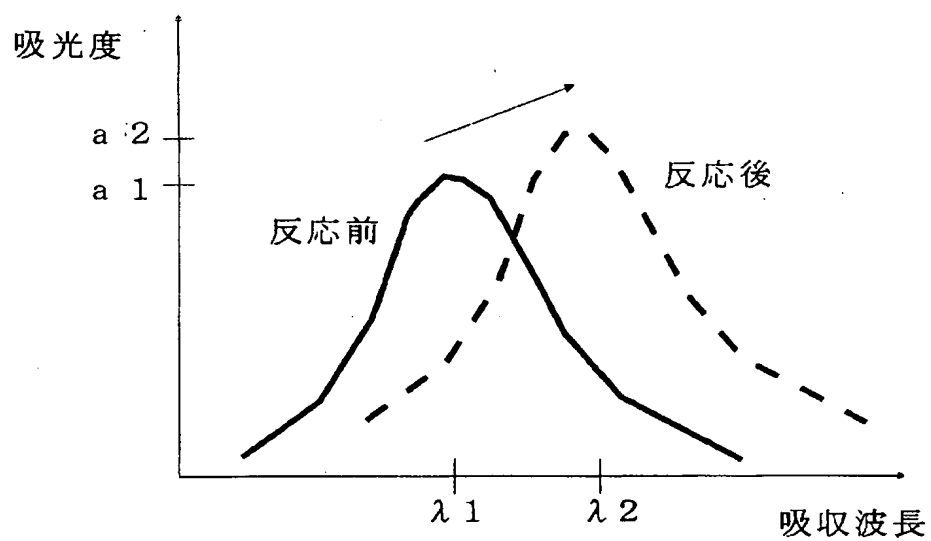
【図 1 1】



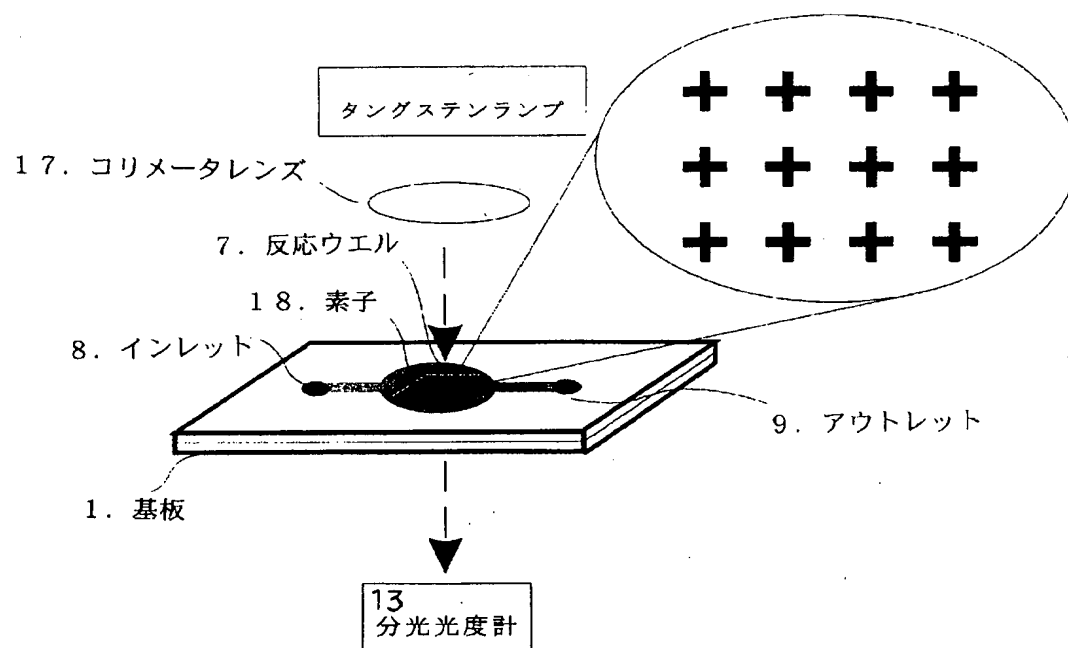
【図 1 2】



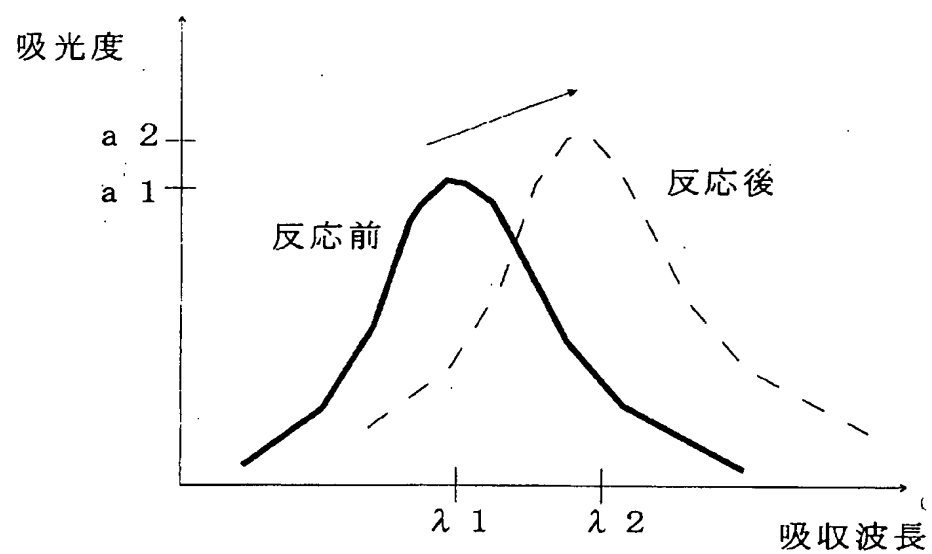
【図 1 3】



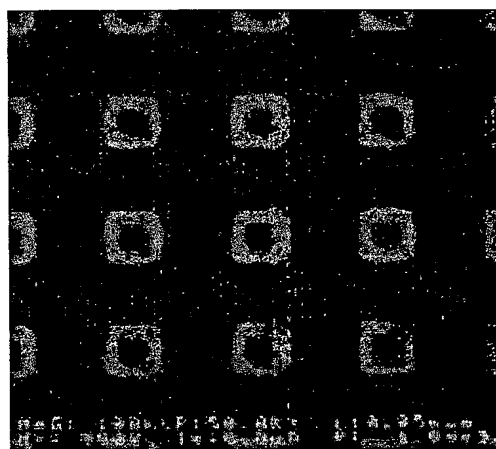
【図 1 4】



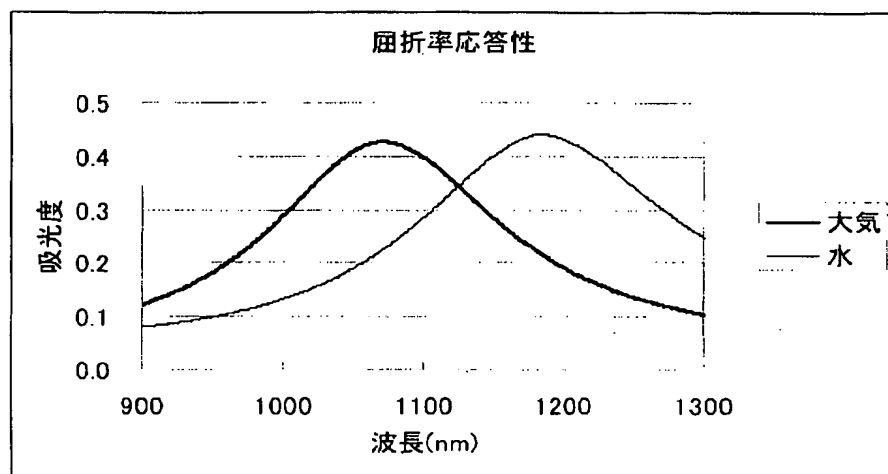
【图 1 5】



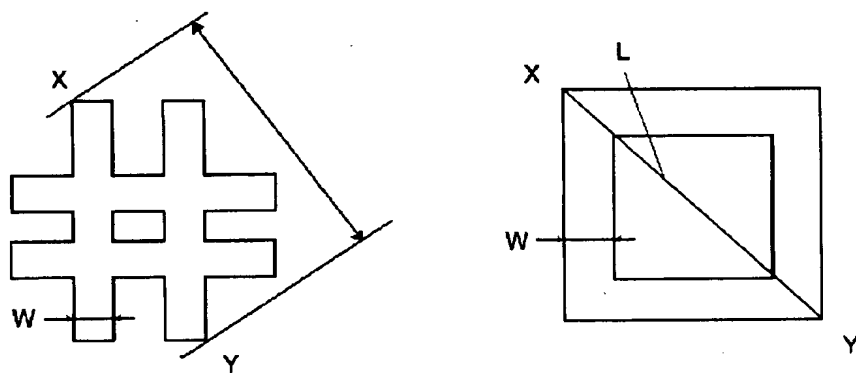
【图 1 6】



【图 1 7】



【图 1 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 局在プラズモン共鳴を利用した標的物質の検出における検出感度を向上させることのできる構成を有する標的物質検出用素子、それを用いた標的物質の検出方法、そのための装置及びキットを提供することにある。

【解決手段】 局在プラズモン共鳴を利用した標的物質の検出における標的物質を捕捉するための標的物質検出用素子として、ループ部及び／または分岐部を有する平面パターンとして形成された金属構造体を基板上に設けた構成のものを用いる。

【選択図】 図 2

出願人履歴

0 0 0 0 0 1 0 0 7

19900830

新規登録

5 9 5 0 1 7 8 5 0

東京都大田区下丸子3丁目30番2号  
キャノン株式会社